

**КЛЕТОЧНЫЕ И МОЛЕКУЛЯРНО–ГЕНЕТИЧЕСКИЕ  
ТЕХНОЛОГИИ ПРИ СОЗДАНИИ МЕЖВИДОВЫХ  
 ГИБРИДОВ *ALOPECURUS PRATENSIS* L.**

<sup>1</sup>*Кондрацкая Ирина Павловна, научный сотрудник*

<sup>2</sup>*Столепченко Валентина Андреевна, к.с–х.н, ст. научный сотрудник*

<sup>1</sup>*Яхимук Андрей Николаевич, научный сотрудник*

<sup>1</sup>*Чижик Ольга Владимировна, к.б.н., зав. лабораторией*

<sup>2</sup>*Васько Петр Петрович, к.б.н., зав. отделом*

<sup>1</sup>*Решетников Владимир Николаевич, академик НАН Беларуси,  
заведующий отделом*

<sup>1</sup>*Центральный ботанический сад НАН Беларуси*

<sup>2</sup>*РУП «Научно–практический центр НАН Беларуси по земледелию»*

Вклад биотехнологии в сельскохозяйственное производство заключается в облегчении традиционных методов селекции растений, разработке

новых молекулярных и клеточных технологий, позволяющих повысить эффективность сельского хозяйства [1]. При создании межвидовых гибридов *Alorpecurus pratensis* L мы использовали метод отдаленной гибридизации, метод эмбриокультуры из незрелой зерновки и ДНК–генотипирование.

Межвидовая и межродовая гибридизация (отдаленная гибридизация) используется в случае, если селекционер ставит задачу получить новые формы в сочетании признаков родительских форм, сильно отличающихся друг от друга. Для отдаленной гибридизации выделяются по одному или нескольким признакам лучшие растения из коллекционных или клоновых питомников (продуктивность, кустистость, облиственность, зимостойкость, устойчивость к болезням). В данной работе гибридизацию проводили в условиях фитотро–тепличного комплекса (ФТК) и в полевых условиях. В фазу полного вымётывания проводилась изоляция растений лисохвоста, в период цветения 12 апреля в ФТК и с 15 мая в поле (рисунок 1). Опыление проводилось при полном цветении метелок без кастрации пыльников.

Для преодоления про– и постгамной несовместимости нами было культивировано на питательную среду более 300 зародышей межвидового гибрида лисохвоста лугового. Специально подобранный состав компонентов питательных сред для культивирования незрелых зародышей предоставляет все необходимые вещества для развития зародыша и, таким образом, заменяет эндосперм. При отдаленной гибридизации в результате рекомбинации генов происходит интенсивный формообразовательный процесс. Это позволяет ускорить отбор перспективных форм, объединяющих геномы в гибридах лисохвоста. Жизнеспособные растения лисохвоста лугового, полученные в результате проведенных биотехнологических работ высаживали в почвенные условия ФТК. Рассада выращивается с проведением подкосов по мере нарастания биомассы при наступлении фазы кущения. Хорошо раскутившиеся растения в условиях ФТК, прошедшие яровизацию, высаживали в полевые условия, в рядки с междурядьем 0,7м x 0,35м.



**Рисунок 1– Изоляция растений лисохвоста лугового в полевых условиях**

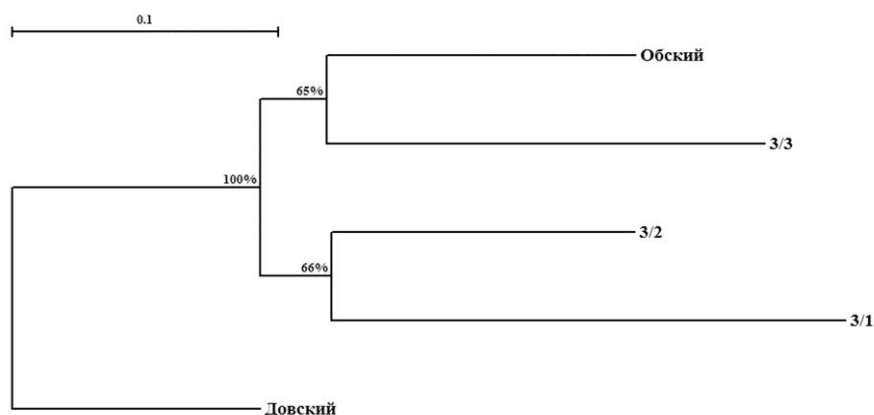


**Рисунок 2 – Индивидуальное размещение лисохвоста лугового (0,7 м X 0,35 м)**

В питомниках селекционного материала межвидовых гибридов лисохвоста, которые были заложены с индивидуальным стоянием (0,7м X 0,7м и 0,7м X 0,35м) растений (рисунок 2), проводилась оценка как глазомерно по 10-ти балльной шкале (мощность растений, характер и уровень облиственности, кустистость, пораженность болезнями и повреждаемость вредителями, реакция на неблагоприятные метеорологические условия), так и прямым учетом с взвешиванием, измерениями, анализами, с пересчетом на одно растение по основным хозяйственно-ценным признакам (продуктивность зеленой и сухой массы и семян).

Растения перспективных сортообразцов лисохвоста лугового наблюдались при прохождении следующих основных фенологических фаз: всходы в год посева, у растений второго года жизни – весеннее отрастание; кущение; выход в трубку; выметывание; цветение; созревание; позднелетнее кущение.

ДНК-маркирования проводилось с использованием техники ПЦР, для чего было отобраны праймеры, маркирующие межмикросателлитные (ISSR-техника) участки ДНК [2]. Для генотипирования было отобрано 5 ISSR –праймеров, обладающих достаточным полиморфизмом и имеющих воспроизводимую амплификационную активность. Для сортообразцов лисохвоста лугового и родительских форм максимальное количество локусов (ДНК-маркеров) 17 было идентифицировано с помощью праймера UBC-810, минимальное — 7 с использованием праймеров IS3 и IS6. В общей сложности было идентифицировано 340 локусов (ДНК-маркеров). Из всего пула маркеров 282 маркера являлись полиморфными и позволило выявить высокий уровень полиморфизма у исследуемых сортообразцов лисохвоста лугового — в среднем 82,94% . На основании 340 ДНК-маркеров, полученных с использованием трех ISSR-праймеров были рассчитаны генетические дистанции и произведена кластеризация исследованных сортообразцов лисохвоста лугового по методу NJ (метод присоединения соседей), сконструированы отдельные дендрограммы для двух вариантов, где корневым таксоном был выбран один из родительских сортов (Довский или Обский). Данные генотипирования выявили сходную топологию изучаемых сортообразцов лисохвоста лугового в обоих вариантах кластеризации. На дендрограммах видно, что гибриды 3/1 и 3/2 генетически более близки с родительской формой Довский, а гибрид 3/3 — с родительской формой Обский. Значения bootstrap-анализа для всех узлов на дендрограммах больше 50%, что указывает на достоверную топологию ветвей.



Корневой таксон *Довский*. Узлы, имеющие достоверную топологию (более 50%), обозначены соответствующим значением bootstrap-анализа (1000 реплик) в %.

**Рисунок 3 – NJ дендрограмма, отражающая степень генетического сходства между сортообразцов лисохвоста лугового на основе 340 ДНК-маркеров**

По данным мультилокусных ISSR-спектров для исследованных образцов лисохвоста лугового впервые в стране составлены генетические паспорта. В таблице приведен пример генетического паспорта сортообразца 3/3 межвидового гибрида лисохвоста лугового.

**Таблица – Мультилокусный генетический паспорт *Alopecurus pratensis* L.. сортообразец 3/3**

Праймеры	Маркеры
ISSR	
IS3 (C)	<sup>4</sup> C <sub>1450</sub> <sup>5</sup> C <sub>1400</sub> <sup>8</sup> C <sub>1244</sub> <sup>10</sup> C <sub>780</sub> <sup>4</sup> C <sub>740</sub> <sup>6</sup> C <sub>705</sub> <sup>6</sup> C <sub>650</sub> <sup>6</sup> C <sub>612</sub> <sup>10</sup> C <sub>555</sub> <sup>7</sup> C <sub>513</sub> <sup>8</sup> C <sub>390</sub> <sup>10</sup> C <sub>373</sub> <sup>5</sup> C <sub>277</sub>
UBC-810 (I)	<sup>6</sup> I <sub>1550</sub> <sup>8</sup> I <sub>1120</sub> <sup>9</sup> I <sub>1050</sub> <sup>10</sup> I <sub>930</sub> <sup>6</sup> I <sub>830</sub> <sup>5</sup> I <sub>660</sub> <sup>6</sup> I <sub>585</sub> <sup>4</sup> I <sub>520</sub>
B4 (U)	<sup>5</sup> U <sub>2500</sub> <sup>5</sup> U <sub>1750</sub> <sup>5</sup> U <sub>1430</sub> <sup>10</sup> U <sub>1200</sub> <sup>8</sup> U <sub>1090</sub> <sup>8</sup> U <sub>960</sub> <sup>8</sup> U <sub>920</sub> <sup>5</sup> U <sub>880</sub> <sup>4</sup> U <sub>706</sub> <sup>3</sup> U <sub>676</sub> <sup>7</sup> U <sub>640</sub> <sup>9</sup> U <sub>540</sub> <sup>7</sup> U <sub>377</sub>
IS6 (F)	F <sub>1505</sub> F <sub>1250</sub> F <sub>930</sub> F <sub>890</sub> F <sub>505</sub> F <sub>470</sub> F <sub>385</sub> F <sub>277</sub> F <sub>232</sub>
H12(H)	H <sub>820</sub> H <sub>785</sub> H <sub>745</sub> H <sub>640</sub> H <sub>555</sub> H <sub>420</sub> H <sub>405</sub> H <sub>390</sub> H <sub>305</sub>

#### Список использованных источников

1. Генетические основы селекции растений. В 4т. Т.4.Биотехнология в селекции растений. Геномика и генетическая инженерия/А.В. Кильчевский, Л.В. Хотылева.– Минск: Беларуская навука, 2014.–653 с.
2. Poyraz, I. An efficient DNA isolation method from *Nigella sativa* L.(Ranunculaceae) seeds for RAPD and ISSR analysis /I. Poyraz// Bilecik Seyh Edebali Universitesi Fen Bilimleri Dergisi, Cilt:1,Sayi:1, 2014.–P.22–27.